UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1940-1941

N° 23

RECHERCHES SUR LES CÉNAPSES LIPIDO-PROTÉIDIQUES DU SÉRUM SANGUIN

COMPORTEMENT DES LIPIDES DANS L'ÉLECTROPHORÈSE

Thèse pour le Doctorat en Médecine

présentée et soutenue publiquement le mercredi 16 juillet 1941

PAR

Auguste-Jean-René REBOUL

Né à Saint-Jean-de-Luz (Basses-Pyrénées), le 17 octobre 1909

Examinateurs de la Thèse

MM. MACHEBŒUF, professeur ..... *Président.*
CREYX, professeur .....
WANGERMEZ, professeur ..... *Juges.*
AURIAC, agrégé .....

BORDEAUX

Imprimerie BIÈRE, 18-20-22, rue du Peugue

1941

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536526_0003

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1940-1941

N° 23

RECHERCHES SUR LES CÉNAPSES LIPIDO-PROTÉIDIQUES DU SÉRUM SANGUIN

COMPORTEMENT DES LIPIDES DANS L'ÉLECTROPHORÈSE

Thèse pour le Doctorat en Médecine

présentée et soutenue publiquement le mercredi 16 juillet 1941

PAR

Auguste-Jean-René REBOUL

Né à Saint-Jean-de-Luz (Basses-Pyrénées), le 17 octobre 1909

Examinateurs de la Thèse

MM. MACHEBŒUF, professeur ..... *Président.*

CREYX, professeur ..... } *Juges.*

WANGERMEZ, professeur ..... } *Juges.*

AURIAC, agrégé ..... } *Juges.*

BORDEAUX

Imprimerie BIÈRE, 18-20-22, rue du Peugue

1941

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

Doyen ..... M. MAURIAC.
Assesseur ..... M. LABAT.
Doyen honoraire ..... M. C. SIGALAS.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. MOURE, DENIGES, BEILLE, CHAVANNAZ, C. SIGALAS
SABRAZES, BEGOUIN, DUPOUY, A. MANDOUL, PETGES, GUYOT, ABADIE.

PROFESSEURS

	MM.
Clinique médicale	MAURIAC. DUPERIE.
Clinique chirurgicale et gynécologique	JEANNENEY.
Clinique chirurgicale	PAPIN.
Pathologie et thérapeutique générales	CARLES.
Clinique d'accouchements.	ANDERODIAS.
Anatomie pathologique et microscopie clinique	DAMADE.
Anatomie	VILLEMIN.
Anatomie générale et histologie	G. DUBREUIL.
Hygiène	LEURET.
Médecine légale et déontologie	LANDE.
Electroradiologie et clin. d'électricité médicale	RECHOU.
Chimie	CHELLE.
Botanique et matière médicale	GOLSE.
Pharmacie	VITTE.
Zoologie et parasitologie	SIGALAS.
Médecine expérimentale	AUBERTIN.
Clinique ophtalmologique.	TEULIERES.
Physiologie	FABRE.

	MM
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	ROCHER.
Clinique médicale des maladies des enfants	CRUCHET.
Chimie biologique et médicale	MACHEBŒUF.
Physique médicale et pharmaceutique	WANGERMEZ.
Médecine coloniale et clinique des maladies exotiques	BONNIN.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	N.
Clin. des mal. des voies urinaires	DUVERGEY.
Clinique des maladies nerveuses et mentales	N.
Clinique d'oto-rhino-laryngologie	PORTMANN.
Toxicologie et hygiène appliquée	LABAT
Hydrologie thérapeutique et climatologie	CREYX.
Clinique odonto-stomatologique	DUBECQ.

LACOSTE (Histologie). PERY (Obstétrique). PERRENS (Maladies mentales).
CHARRIER (Chirurgie générale).

AGRÉGÉS EN EXERCICE

	MM.
Anatomie	DUFOUR.
Physiologie	FRANCK.
Médecine générale	PIECHAUD. DELMAS-MARSALET. DE GRAILLY. FONTAN. BROUSTET. DERVILLEE. SARIC. DUBARRY.
Chirurgie générale	LOUBAT. MASSE. DARGET. MAGENDIE. POUYANNE.

	MM.
Obstétrique	RIVIERE. MAHON.
Ophtalmologie	BEAUVIEUX.
Oto rhino-laryngologie	DESPONS.
Dermatologie et syphiligraphie	JOULIA.
Physique médicale	AURIAC.
Chimie générale pharmaceutique et toxicologie	CASTAGNOU
Histoire naturelle pharmaceutique	GIRARD.
Pharmacie	MESNARD. GRANGER.
Histoire naturelle médicaleet parasitologie	R MANDOUL.

COURS COMPLÉMENTAIRES :

	MM.
Médecine opératoire	JEANNENEY.
Accouchements	RIVIERE.
Pathologie médicale	DELMAS-MARSALET.
Puériculture	FAUGERE.
Zoologie et parasitologie	R. SIGALAS.
Médecine légale	DERVILLEE
Urologie	DARGET.
Législat. pharmaceutique.	POPLAWSKI.
Ophtalmologie	BEAUVIEUX.

	MM.
Physique médicale et pharmaceutique	AURIAC.
Anatomie	J.BEAUVIEUX
Chimie minérale	CASTAGNOU.
Botanique	GIRARD.
Pharmacie galénique	MESNARD.
Bactériologie	MOUREAU.
Physiologie	LIARD.

Le Secrétaire de la Faculté : ROUGERIE.

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les Thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

A MA MÈRE

A MON PÈRE

A MA FEMME

AUX MIENS

A MES AMIS

A MES CAMARADES DU LABORATOIRE DE CHIMIE BIOLOGIQUE ET MÉDICALE DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

A Mademoiselle FAURE

ASSISTANTE DE CHIMIE BIOLOGIQUE ET MÉDICALE
A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX
DOCTEUR ÈS SCIENCES

ET

A Monsieur F. TAYEAU

CHARGÉ DE CONFÉRENCES DE CHIMIE BIOLOGIQUE
A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX
DOCTEUR ÈS SCIENCES

En remerciement des précieux renseignements qu'ils nous ont fournis au cours de notre travail.

A MES CAMARADES D'INTERNAT

A MES MAITRES DE LA FACULTÉ ET DES HOPITAUX

A Monsieur le Docteur LARTIGAUT

MÉDECIN ASSISTANT A LA MAISON MATERNELLE DES HOSPICES

A Monsieur le Docteur M. TRAISSAC

MÉDECIN DES HOPITAUX

A Monsieur le Docteur E. DUBOURG

MÉDECIN DES HOPITAUX

A Monsieur le Docteur BOISSERIE-LACROIX

MÉDECIN DES HOPITAUX
CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

Hommage respectueux et témoignage de profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur agrégé DELMAS-MARSALET

MÉDECIN DES HOPITAUX
CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR
CROIX DE GUERRE
OFFICIER DE L'INSTRUCTION PUBLIQUE

A MES JUGES

Monsieur le Professeur agrégé AURIAC

Monsieur le Professeur WANGERMEZ

PROFESSEUR DE PHYSIQUE MÉDICALE ET PHARMACEUTIQUE
ÉLECTRO-RADIOLOGISTE DES HOPITAUX
SOUS-DIRECTEUR DU CENTRE RÉGIONAL DE LUTTE
CONTRE LE CANCER DE BORDEAUX ET DU SUD-OUEST
OFFICIER D'ACADÉMIE

Monsieur le Professeur CREYX

PROFESSEUR D'HYDROLOGIE THÉRAPEUTIQUE ET CLIMATOLOGIE
MÉDECIN DES HOPITAUX
CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR
CROIX DE GUERRE
OFFICIER DE L'INSTRUCTION PUBLIQUE

Dont nous avons eu l'honneur d'être l'interne et qui a bien voulu accepter de faire partie de notre jury de thèse.

A NOTRE PRÉSIDENT DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR M.-A. MACHEBŒUF

PROFESSEUR DE CHIMIE BIOLOGIQUE ET MÉDICALE
A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX
DOCTEUR ÉS SCIENCES
CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR
OFFICIER D'ACADÉMIE

Qui nous a inspiré le sujet de ce travail, puis nous a prodigué ses conseils éclairés et ses judicieuses critiques. Nous avons pu apprécier durant notre séjour, malheureusement trop court, dans son laboratoire, l'immense étendue de ses connaissances et la remarquable fécondité de son esprit qui, jointes à une extraordinaire habileté technique, en font un chercheur heureux et toujours au travail.

Nous sommes fier d'avoir pu travailler avec un tel maître.

AVANT-PROPOS

Cette thèse a été faite dans le laboratoire de chimie biologique et médicale de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux, sous la direction de M. le Professeur Machebœuf.

Une deuxième thèse a été faite en même temps, dans le même laboratoire, sur un sujet connexe, par Mlle Henriette Vanaud, interne en pharmacie.

Nous avons constamment confronté les résultats de nos expériences et nos deux travaux constituent un tout.

Nous tenons à remercier ici Mlle Vanaud de sa précieuse collaboration.

INTRODUCTION

Parmi les protéides du sérum : globulines (euglobulines, pseudo-globulines) et albumines, certains sont liés à des lipides pour former des agrégats : les cénapses lipido-protéidiques.

Ce fait confère aux lipides leurs caractères de solubilité dans la phase aqueuse qu'est le sérum. A chacune des principales fractions protéidiques sont liés des lipides en quantités variables.

Certaines cénapses lipido-protéidiques ont pu être isolées en des fractions bien définies. Ceci a permis de pousser déjà fort loin leur étude physico-chimique et biologique (43-46-48-47-69).

De belles recherches ont permis de préciser le mode d'union de certains lipides avec des protéides : simple union physique par affinité réciproque (solvatation) des chaînes polyméthyléniques des lipides ou de certains de leurs noyaux cycliniques avec des portions analogues des molécules protéidiques (33-34-35-36-38-39).

Ces notions sur la constitution des cénapses lipido-protéidiques ont permis de réaliser la synthèse de cénapses protéides-acides gras (47) et ce fait vérifie les conceptions ci-dessus résumées sur la notion des liaisons entre protéides et lipides.

Le problème de l'état physico-chimique des lipides dans la matière vivante, et tout particulièrement des lipides plasmatiques est très avancé.

Nous avons cherché à contribuer à la solution de ce problème en cherchant quelle est l'action de l'électrophorèse sur de

telles cénapses, quel est le comportement des lipides durant cette opération.

Nous pouvions en effet penser que certaines cénapses du sérum (cénapses acido-précipitables de Machebœuf, euglobulines, etc...) n'étaient que des précipités mixtes dans lesquelles se rassemblaient par coacervation ou similitude des caractères de solubilité, d'une part des protéides, d'autre part des micelles lipidiques. Pour démontrer définitivement que les lipides n'étaient pas dans le sérum à l'état de micelles indépendantes des protéides, il fallait démontrer que la liaison existe, même en solution.

De nombreux faits mis en évidence par Machebœuf et divers de ses collaborateurs, constituaient déjà à vrai dire, presque une démonstration.

Nous espérons avoir apporté une preuve indiscutable de la permanence de la liaison en montrant que protéides et lipides se déplacent de concert sous l'influence d'une force électromotrice.

Jamais dans nos appareils à électrophorèse, les fractions protéidiques ne se sont séparées des fractions lipidiques, comme cela aurait été le cas si lipides et protéides avaient été libres de toute union entre eux.

La plupart des lipides et des substances lipoïdiques (graisses neutres, stérides et stérols) ne sont pas ionisables. Leur transport par électrophorèse ne se comprend que si elles sont soudées à d'autres substances qui le sont.

Si de plus, comme nous l'avons constaté, lipides et protéides se déplacent à la même vitesse, nous sommes forcés d'admettre que les substances ionisables soudées aux lipides sont bien des protéides.

Nous avons établi ce fait sur des sérums normaux. Mais nous avons aussi fait porter notre étude sur des sérums pathologiques, choisis pour leur richesse en lipides. Chez ceux-ci nous avons pu montrer que l'abondance des lipides combinés est parfois telle qu'il n'existe pratiquement plus d'albumine libre, mais seulement des cénapses lipido-protéidiques.

CHAPITRE PREMIER

I. Protéides et lipides du sérum sanguin
II. Cénapses lipido-protéidiques de Machebœuf
III. Electrophorèse des protéides du sérum.

I. PROTÉIDES ET LIPIDES DU SÉRUM SANGUIN

1. Les protéides du sérum sanguin.

Le sérum sanguin des divers mammifères contient près du dixième de son poids de protéides (90 à 95 grammes chez l'homme par litre). Des travaux déjà très anciens avaient montré qu'il ne s'agissait pas d'un protéide unique : (Panum 54, Hofmeister 26 et ses élèves 27, Schmidt 62 et Hammarsten 18).

On différencie les albumines des globulines dans le sérum, par leurs caractères de solubilité et par l'ultra-centrifugation.

Albumines.

La fraction albumine est remarquablement homogène. Guerber (16) et Hofmeister (25) l'obtinrent cristallisée voici longtemps déjà.

Tous les essais de fractionnement (Robertson 60 etc.) qui eurent lieu par la suite furent critiqués (13-64).

Il semble actuellement difficile d'admettre des fractions albuminiques distinctes. Les belles recherches de Svedberg (65-68-66) par ultra-centrifugation et de Tiselius (74-75-76-77) par électrophorèse montrent d'ailleurs que les albumines constituent dans le sérum une fraction vraiment homogène.

Globulines.

La fraction globuline est au contraire un mélange que l'on peut fractionner par bien des méthodes.

Marcus Emil (50), Spiro (56), Porges et Fuld (57) emploient des méthodes différentes pour séparer des fractions insolu-

bles (euglobulines) et des fractions solubles (pseudo-globulines).

De la non-concordance des méthodes d'obtention des globulines, de leur manque de précision aussi, naquit une confusion regrettable. Dans un travail récent, ainsi que nous le verrons plus loin, Battut a eu le mérite de mettre un peu d'ordre dans cette question.

Différences entre albumines et globulines.

Nombreux sont les chercheurs qui essayèrent de différencier chimiquement albumines et globulines. Nous citerons les noms de : Hammarsten (18), Piettre (58), Achart et Grigaut (3), Metzger (51), Malerba (49), Schultz (63), Mœrner (52), Fleitmann (12) qui dosèrent les éléments (carbone, oxygène, etc...)

Abderhalden (1) et ses élèves (2) dosèrent les acides aminés contenus dans la sérum-albumine et la sérum-globuline.

Tous ces chiffres n'ont qu'une valeur relative, ils se sont révélés fort variables selon les chercheurs (17-28-14-24-53).

Par l'ultra-centrifugation : Svedberg (65-68) a montré que la sérum-globuline a un poids moléculaire d'environ 150.000 tandis que la sérum-albumine en a un de 70.000 environ[1].

Enfin dans une série de très belles recherches, Tiselius par l'électrophorèse a confirmé les résultats de Svedberg et a montré que les globulines se divisent en trois fractions α, β et γ, cette dernière étant particulièrement importante dans les sérums d'animaux hyperimmunisés, où elle contient les anticorps.

1. Ces chiffres, remarquons-le, sont des multiples approximatifs de 17.600 (4 fois pour l'albumine, 8 fois pour la globuline). Ce chiffre de 17.600 est le poids moléculaire le plus faible des protéides, celui des érythrocruorines, cytochrome, etc...

Définitions à adopter.

Comme il résulte des faits que nous venons de résumer, et ainsi que l'a fait récemment remarquer Battut (5), il faut avant d'utiliser les termes de globulines, albumines, euglobulines et pseudo-globulines, les définir avec soin.

Dans le présent travail, nous utiliserons la nomenclature de Hofmeister (30-31), nous appellerons :

Globulines du sérum, les protéides précipitant lorsque l'on ajoute au sérum un égal volume d'une solution saturée et préalablement neutralisée de sulfate d'ammonium.

Euglobulines, les protéides précipitant lorsque l'on soumet le sérum à une dialyse prolongée vis-à-vis d'eau distillée refroidie et fréquemment renouvelée.

Pseudo-globulines, les protéides qui, après élimination des euglobulines par dialyse, précipitent lorsque l'on ajoute au liquide un égal volume d'une solution saturée et neutralisée de sulfate d'ammonium.

Albumines, les protéides qui restent en solution lorsque l'on ajoute au sérum un égal volume de solution saturée et neutralisée de sulfate d'ammonium, mais qui précipitent lorsque l'on sature le sérum au moyen de sulfate d'ammonium.

Notions récentes sur la constitution des protéides[1].

Tout protéide est constitué par l'union de très nombreuses molécules d'amino-acides divers liés entre eux par formation de fonctions amides, la fonction acide de chaque amino-acide ayant réagi avec la fonction amine de son voisin.

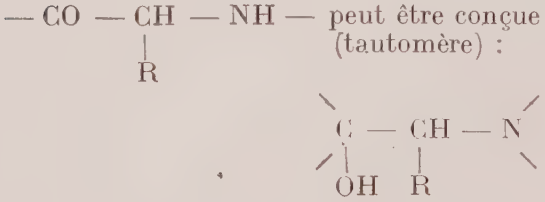
On a pensé que des chaînes relativement courtes d'amino-acides étaient associées en paquets pour former une molécule de protéides. Les liaisons entre chaînes seraient d'ailleurs

1. La majeure partie de ce paragraphe est empruntée à M. Machebœuf : « A propos de la réactivité des protéides », *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1940, **22**, 351 à 368.

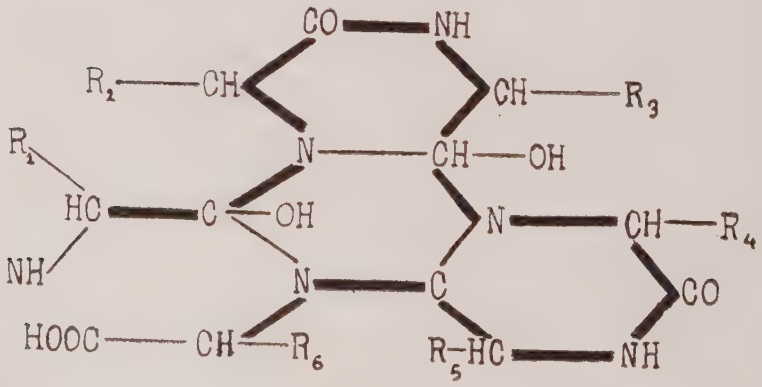
dans de nombreux cas assez labiles et ceci permettrait à certains fragments de la molécule de se séparer assez facilement et même ensuite de s'associer à nouveau d'une façon plus ou moins réversible (Sörensen).

On peut aussi concevoir l'architecture de la molécule protéidique comme le fait Miss Wrinch (82).

L'unité élémentaire constitutive des protéides que l'on représente habituellement par :



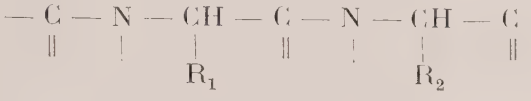
Elle présente alors deux valences libres à chaque extrémité. Par ces valences se formeraient de nombreux cycles et la chaîne protéidique formerait un réseau à mailles hexagonales tel celui figuré ci-dessous :



Dans ce schéma, nous avons représenté, en traits épais, les valences appartenant à la chaîne fondamentale telle qu'elle est conçue habituellement dans la théorie non cyclique.

En somme, selon la théorie de Miss Wrinch, l'ensemble formerait un réseau plan hérissé de place en place par des chaînes latérales, R_1 R_2..... R_n.

Qu'importe d'ailleurs, pour ce qui nous occupe ici, que la chaîne fondamentale :



soit linéaire ou polycyclique ?

Il nous importe seulement de savoir qu'elle existe et que sur elle sont attachées de très nombreuses chaînes latérales : R_1 R_2..... R_n qui, par les fonctions chimiques qu'elles contiennent, confèrent au protéide toutes ses propriétés chimiques principales, et la plupart de ses propriétés physiques.

La surface d'une molécule protéidique est donc hérissée de chaînes latérales, porteuses de fonctions chimiques, de propriétés très diverses, et la molécule est un immense édifice aux affinités multiples.

Nous sommes loin de la conception ancienne des micelles à peu près dénuées d'affinités pour les substances dissoutes dans la phase ambiante.

On tend, au contraire, à admettre aujourd'hui que les protéides peuvent réagir avec de nombreuses et très diverses substances pour former des ensembles (cénapses) (33), dont les propriétés très particulières rendent compte d'un grand nombre de phénomènes obscurs jusqu'alors.

Les protéides sont, semble-t-il, les éléments réactifs primordiaux de la matière vivante, dans laquelle évoluent des réactions très nombreuses qui paraissent à première vue irréalisables en dehors de la vie.

C'est avant tout aux propriétés physico-chimiques des protéides présents dans la matière vivante qu'est due l'évolution de ces réactions.

2. Les lipides du sérum sanguin.

Le sérum sanguin des mammifères, de l'homme en particulier, présente l'aspect d'une solution homogène.

L'ultra-microscope est incapable d'y révéler des discontinuités; cependant ce sérum renferme des quantités assez importantes de substances lipoïdiques : 3 à 8 grammes par litre d'un mélange de glycérides, de phosphatides, de stérides et de stérols.

Quoique toutes insolubles dans l'eau et solubles dans l'éther, elles sont en pratique complètement inextractibles par l'éther. L'éther agité avec du sérum de cheval n'extrait que 1 p. 100 environ des lipides totaux de ce sérum (anciens travaux de Hope-Seyler, ceux plus récents de Hardy 20, Haslam 23, Chick 10, Hartley 22). Machebœuf et Wahl (36-37) montrèrent en 1931 que l'éther laissé en présence de sérum pendant des mois n'extrait qu'une faible quantité de ces lipides.

Un fait est donc fondamental : il existe des lipides en solution homogène dans un milieu aqueux : le sérum. Pour expliquer ce fait, on avait entrevu la possibilité de liaison entre les lipides et les protéides. Divers auteurs essayèrent de voir à quels protéides étaient liés les lipides, et dans quelles proportions. Pour cela ils eurent recours soit à la dénaturation des protéides au moyen de l'alcool chaud, soit au procédé de Hardy et Mme Gardiner (21) (ce procédé ne dénature pas sensiblement les protéides qui conservent en particulier intacts leurs caractères de solubilité).

Bang (4) fut le premier à soutenir que le cholestérol est probablement lié aux protéides. Par la suite et sans preuves bien concluantes, divers auteurs dont Young, 1922 (83), Handowsky (19), Lohmann et Bosse, 1925 (19), Troendegaard et B. Koudahl 1926 (79), Theorell (70-71-72-73) arrivèrent à des conclusions analogues.

Gardner et Gainsborough (15) publièrent en 1927 quelques résultats intéressants :

Dans le plasma sanguin, le cholestérol est partiellement entraîné avec les divers protéides lors de leur précipitation par le sulfate d'ammonium.

Le précipité des euglobulines contient 15 p. 100 du cholestérol total du sérum.

Le précipité des pseudoglobulines : 17 p. 100. Enfin, il reste 68 p. 100 du cholestérol en solution avec les albumines, dans les eaux-mères des globulines.

Les travaux plus récents de Machebœuf et Wahl (36-37), Machebœuf et Fethke (40) nous donnent les chiffres suivants :

Lipides totaux du sérum : 6 à 8 g. p. 1000.

Lipides entraînés par la précipitation des globulines : 2 g. à 3 g. 5 p. 1000.

Lipides entraînés par la précipitation des albumines : 3 g. à 5 g. 5 p. 1000.

Rapport $\frac{\text{Lipides des albumines}}{\text{Lipides des globulines}}$: 1,50 en moyenne

Acides gras totaux : 3 à 4 g. p. 1000.
— des albumines : 2 à 3 g. p. 1000.
— des globulines : 1 g. 3 à 1 g. 5 p. 1000.

Insaponifiable total : 1 g. 8 à 2 g. 5 p. 1000.
— des albumines 1 g. 2 à 1 g. 8 p. 1.000.
— des globulines : 0 g. 6 à 0 g. 8 p. 1000.

Rapport $\frac{\text{Insaponifiable des albumines}}{\text{Insaponifiable des globulines}}$: 1,3 à 2.

Cholestérol total : 1 g. 5 p. 1000.
— des albumines : 1 g. p. 1000.
— des globulines : 0 g. 50 p. 1000.

Rapport $\frac{\text{Cholestérol des albumines}}{\text{Cholestérol des globulines}}$: 1,5 à 2.

Insaponifiable X total : 0 g. 80 à 1 g. p. 1000.
— des albumines : 0 g. 50 p. 1000.
— des globulines : 0 g. 30 p. 1000.

Rapport $\frac{\text{Insaponifiable X des albumines}}{\text{Insaponifiable X des globulines}}$: 1 à 2.

Tous les travaux que nous avons cités, concernant protéides ou lipides, nous conduisent à admettre que leur étude ne saurait les séparer arbitrairement. Aussi allons-nous exposer maintenant les notions actuelles sur leurs liaisons, c'est-à-dire le problème des cénapses lipido-protéidiques.

II. LES CÉNAPSES LIPIDO-PROTÉIDIQUES

1. Historique des cénapses.

Travaux de Machebœuf et de ses collaborateurs.

Pour être certain de l'existence des complexes lipido-protéidiques et se faire une idée de leur nature, il fallait en obtenir certains séparés d'avec les autres constituants du sérum, pour les soumettre à une étude physico-chimique convenable.

C'est à ce problème que Machebœuf a consacré toute une série de travaux (34-35).

Il partit de la solution des albumines (et des lipides) obtenue après précipitation des globulines du sérum par le sulfate d'ammonium à demi-saturation.

Il montra que si l'on ajoute un peu plus de sulfate d'ammonium et d'acide sulfurique dilué à $\frac{N}{5}$, jusqu'à ce que le pH soit de 3,8, la précipitation des albumines et des lipides est, à très peu près, quantitative.

Fait très remarquable, le précipité obtenu se remet parfaitement en solution limpide si l'on ramène le pH à 7 ou au delà. La précipitation des lipides est donc parfaitement réversible.

Cette réversibilité est un argument nouveau en faveur d'un état très spécial des lipides, car, pour toutes les émulsions aqueuses de lipides, que l'on peut préparer artificiellement, une telle réversibilité n'est jamais constatée.

Lorsque l'ensemble albumines et lipides est ainsi remis en solution, grâce à de l'eau distillée et à la petite quantité d'ammoniaque diluée nécessaire pour ramener à la neutra-

lité, on peut en acidifiant à nouveau à pH 3,8 obtenir la précipitation d'une notable quantité de substance, mais comme la teneur en sels neutres est beaucoup moins élevée que lors de la première précipitation des albumines, la majeure partie des protéides reste en solution.

Le nouveau précipité est très riche en lipides.

Tous les lipides cependant ne sont pas précipités.

Il en reste une fraction assez notable dans les eaux-mères. Ce fait montre une fois de plus combien est grande la stabilité de l'état dissous de certains lipides qui restent ainsi en solution dans l'eau en présence de quantités assez notables encore de sulfate d'ammonium, et en milieu acide (pH 3,8).

Le précipité qui est constitué de protéides et de lipides est encore parfaitement soluble dans l'eau si l'on ramène le pH à 7 environ.

La réversibilité de la précipitation des lipides est complète et pourtant la quantité de protéides qui les accompagnent est beaucoup moins forte que lors de la première précipitation.

Après avoir dissous ainsi une deuxième fois le précipité dans de l'eau, grâce à la quantité d'ammoniaque nécessaire pour neutraliser, on peut opérer une troisième précipitation qui se fait en présence de moins de sel que la deuxième, et ainsi on peut continuer une série de dissolutions dans l'eau à pH 7 (ou supérieur à 7), suivies chacune d'une précipitation par acidification à pH 3,8.

Pour chaque précipitation, il reste dans les eaux-mères les substances le moins facilement précipitables par acidification.

Pendant les 4 ou 5 premières précipitations, le précipité s'enrichit en lipides et s'appauvrit en protéides, mais, par la suite, sa composition reste constante, et le contenu des eaux-mères finit par avoir une constitution semblable à celle du précipité. Les caractères physico-chimiques de cette fraction sont fort remarquables :

1° Elle ne précipite pas en milieu neutre par addition de quantités même notables de sels neutres (sulfate d'ammonium à demi-saturation par exemple);

2° Les solutions aqueuses sont parfaitement limpides et pourtant, cette fraction si soluble dans l'eau est constituée par moins de 60 p. 100 seulement de protéides, et plus de 40 p. 100 de lipides (phosphatides et stérides);

3° Les solutions aqueuses agitées avec de l'éther ne livrent pas leurs lipides à l'éther, même en présence de sulfate d'ammonium;

4° Si à une solution aqueuse de cette fraction, à pH 7,4, on ajoute de l'alcool absolu : la précipitation est nulle si la solution est diluée, ou seulement très incomplète si la solution est concentrée;

5° Parmi les lipides contenus dans la fraction étudiée, il est des esters de cholestérol peu solubles à froid dans l'alcool à 80°, ces stérides sont cependant avec l'ensemble de la fraction dans ce solvant;

6° Certaines des propriétés chimiques des lipides sont elles aussi modifiées : coloration par le Soudan III, ou l'oxyde d'osmium par exemple.

Chacun des constituants de la fraction : protéides, stérides, phosphatides, présente donc dans cette fraction des caractères de solubilité dans l'eau, dans l'alcool ou dans l'éther complètement différents des caractères qu'il présente lorsqu'il est isolé.

D'autres expériences démontrèrent à Machebœuf, que ces propriétés particulières des lipides et des protéides sont bien dues à leur action réciproque et qu'il n'existe pas dans la fraction de substances inconnues possédant la propriété de solubiliser les lipides dans l'eau.

Les termes de « complexes » déjà utilisés par Werner et de « symplexes » proposé par Wilstaëtter (81) pour désigner tous les ensembles formés d'une façon comparable à certains glyco-protéides, furent rejetés par Machebœuf et il créa, pour désigner les produits que nous venons d'étudier, le terme de « cénapses » (de κοινός et ἅπτω) qui est actuellement universellement adopté.

Machebœuf montra par la suite que de telles cénapses

lipido-albuminiques pouvaient être obtenues d'une façon encore plus simple sans risquer par des manipulations trop énergiques de créer des artefacts. Il suffit pour cela de partir de la solution des albumines du sérum débarrassées des globulines par le sulfate d'ammonium à demi-saturation. On ajoute à cette solution un sixième de son volume de solution saturée de sulfate d'ammonium, puis de l'acide sulfurique dilué ($\frac{N}{5}$) jusqu'à ce que le pH soit de 4 environ. On recueille rapidement le précipité par centrifugation. Il contient, nous l'avons vu, tous les protéides et tous les lipides qui les accompagnent. On reprend ce précipité par de l'eau distillée qui laisse insoluble une fraction assez notable. On lave cette fraction à plusieurs reprises avec de l'eau distillée. Le résidu insoluble est constitué par des lipides et des protéides en quantités à peu près égales. Cet ensemble cependant est parfaitement soluble dans l'eau si l'on ajoute la petite quantité d'ammoniaque diluée nécessaire pour ramener le pH à 7. La solution obtenue est limpide malgré sa haute teneur en lipides et sa teneur relativement faible en protéides. Elle ne livre pas ses lipides à l'éther, elle ne précipite pas par addition de quantités assez notables de sels neutres. Les protéides sont mal précipités par l'alcool froid. Nous sommes donc ici en présence de cénapses lipido-protéidiques, bien que les manipulations nécessaires pour les obtenir soient brèves et peu énergiques : une simple acidification vers pH 4 suivie de lavages à l'eau distillée. On peut même obtenir par la même méthode une fraction comparable, en acidifiant moins encore et en opérant à pH 4,7 comme pour la cristallisation de la sérum-albumine. Si l'on opère ainsi à pH 4,7 on se trouve au point isoélectrique des albumines, dans les conditions habituelles de leur purification et de leur cristallisation. Il est donc difficile d'admettre que les cénapses lipido-protéidiques que l'on obtient soient formés grâce à une dénaturation des albumines. Enfin, Machebœuf et Mme Januskiewicz (42) démontrèrent que les protéides qui entrent dans la constitu-

tion des cénapses isolées du sérum sont bien des protéides non dénaturés et identiques aux albumines du sérum. Ceci démontrait définitivement l'existence des cénapses dans le sérum.

L'existence des cénapses lipido-protéidiques dans les tissus et les humeurs de l'organisme est tellement générale qu'il est toujours extrêmement difficile d'obtenir des protéides purifiés, parfaitement exempts de lipides. On doit utiliser, pour arracher les lipides, des techniques spécialement adaptées à la décomposition des cénapses lipido-protéidiques : technique de Hardy et Gardiner (21), technique de Machebœuf et Tayeau (44-48).

Ces travaux démontraient l'existence de cénapses lipido-albuminiques; d'autres recherches montrèrent ensuite l'existence de cénapses lipido-globuliniques. Nous citerons à ce sujet les travaux de Machebœuf et Sandor (39, 41), ceux de Machebœuf et Tayeau (44) et nous rappellerons ceux de Trœnsegaard et Koudahl (79, 80).

2. Essais d'interprétation des liaisons dans les cénapses.

Mais comment concevoir ces unions dans les cénapses lipido-protéidiques? Si les chimistes conçoivent aisément la possibilité de combinaisons dissociables ou non entre les fonctions acides, amines, alcools, phénols, thiols, que l'on trouve éparses dans les chaînes latérales des protéides, avec des amides, des bases, des alcools même; ils conçoivent difficilement que des substances aussi peu douées d'affinités chimiques que des lipides ou du cholestérol puissent s'unir à des protéides. Il ne s'agit probablement pas alors, le plus souvent, de combinaisons chimiques, proprement dites, mais de liaisons de stabilité souvent très faibles.

Tout semble démontrer, par exemple, que l'association des lipides et des protéides se fait dans beaucoup de cas par une simple « solvatation » réciproque des parties semblables des molécules protéidiques et des molécules lipidiques.

Il existe dans les molécules des protéides, des chaînes latérales paraffines, telles que :

$$— CH^2 — CH^2 — CH_3 — \text{(reste de valine)} \quad \text{et}$$
$$— CH^2 — CH^2 — CH^2 — CH_3 — \text{(reste de leucine)}$$

Ces chaînes apolaires n'ont aucune hydrophilie, mais elles sont identiques aux chaînes polyméthyléniques paraffines des lipides.

On sait aujourd'hui (11) que dans une solution de savon, les ions d'acides gras tels que $CH^3 — CH^2 — CH^2 ... CH^2 — COO^-$ qui présentent un pôle hydrophile $— COO^-$ et une chaîne paraffine non hydrophile, s'assemblent pour former des ions compliqués. Ces ions complexes sont constitués chacun par un nombre défini d'ions simples assemblés en boules irrégulières dans lesquelles les acides gras sont orientés de telle façon que le pôle hydrophile de chacun soit en surface, tandis que leurs chaînes paraffines sont groupées au sein de la boule.

Pour effectuer cet arrangement, trois forces combinent leurs effets :

1. L'affinité des pôles acides pour l'eau;
2. L'hydrophobie des chaînes paraffines;
3. L'affinité de dissolution réciproque des chaînes paraffines, leur solvatation réciproque.

La plus importante de ces trois forces est très vraisemblablement la première. On peut penser que dans le cas des lipides et des protéides, si l'on parvient à placer les chaînes paraffines des lipides en contact convenable avec les chaînes paraffines des protéides, une association de même type peut se faire. Les molécules lipidiques s'accolant à leurs homologues : les chaînes paraffines des protéides, tandis que le pôle ester des lipides s'orienterait vers l'eau avec laquelle sont déjà en liaison toutes les nombreuses fonctions hydrophiles des protéides. Ce sont ces fonctions hydrophiles des protéides qui confèrent à l'ensemble sa solubilité dans l'eau. Les molé-

cules lipidiques sont entraînées en solution à l'état de simples satellites, accrochés aux chaînes paraffines des molécules protéidiques.

Quels sont les faits qui plaident en faveur de cette conception qui fut proposée par Machebœuf et Sandor (41) voici déjà une dizaine d'années, et qui, depuis lors, fut à maintes reprises étayée par des constatations expérimentales nombreuses ?

1° Diverses cénapses lipido-protéidiques sont solubles dans l'eau et leurs lipides ne sont pas extraits de la solution par l'éther. On peut concevoir que l'éther ne peut aborder les cénapses que par la zone hydrophile qui en constitue la périphérie, et ne peut pas pénétrer l'ambiance aqueuse liée qui l'environne.

On pouvait donc penser qu'une modification de la phase aqueuse tendant à diminuer ou à disloquer l'ambiance aqueuse des molécules protéidiques permettrait peut-être à l'éther de pénétrer jusqu'au sein des cénapses et d'entrer en contact avec les lipides pour les dissoudre. Machebœuf et Sandor (39) puis Machebœuf et Delage, puis Delage (11) ont montré que l'addition à la solution de très petites quantités d'alcool ou de solvants divers solubles à la fois dans l'eau et dans l'éther (acétone, alcools divers) permettait à l'éther d'arracher les lipides à de nombreuses cénapses.

2° Si c'est bien à l'action des chaînes paraffines qu'est due la liaison entre protéides et lipides, l'addition en excès à la solution de cénapses de substances hydro-solubles constituées elles-mêmes par des chaînes paraffines, devrait, par simple action de masse, arracher les lipides des cénapses.

En effet, si l'affinité des protéides pour des chaînes paraffines intervient dans la liaison protéides-lipides, d'autres chaînes paraffines peuvent satisfaire cette affinité, et prendre la place des lipides en les libérant des cénapses. Machebœuf et Tayeau (45, 69) ont montré effectivement que si l'on ajoute à du sérum sanguin, une solution de savon de sodium en quantité suffisante, on voit les lipides du sérum précipiter

et devenir solubles dans l'éther. Le déplacement des lipides des cénapses par les savons est tellement net qu'il permet dans certains cas (globulines du sérum) la délipidation totale des protéides (technique de délipidation des globulines de Machebœuf et Tayeau (45). Cependant certaines cénapses lipido-protéidiques très particulières et d'ailleurs peu abondantes (cénapses acido-précipitables de Machebœuf) résistent à l'action combinée des savons et de l'éther, pour ces cénapses, on doit envisager un processus de liaison lipido-protéidique particulier, différent de la solvatation réciproque des chaînes paraffines.

Dans un récent travail, Tayeau (69 *bis*) a effectué quelques recherches qui lui ont permis d'envisager un nouveau mode d'union entre les protéides et le cholestérol dans certaines cénapses cholestéro-protéidiques.

En étudiant l'action des saponosides sur le sérum sanguin, cet auteur a constaté que ces hétérosides, dont l'aglycone possède un cycle très voisin du cyclopentènephénanthrène, possèdent la propriété de *décoller* quantitativement le cholestérol du sérum sans déplacer les phosphatides qui restent intimement liées aux protéides.

Ces résultats ont permis à Tayeau de penser que, dans certaines cénapses cholestéro-protéidiques, cholestérol et protéides seraient unis entre eux, grâce à une certaine analogie existant entre le cyclopentènephénanthrène et certains cycles ou noyaux formés par les protéides (Fischer, Abderhalden, Karrer, Troensegaard, Bergmann et tout récemment Wrinch).

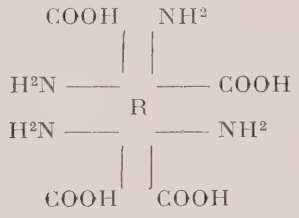
En somme, la liaison des protéides avec les lipides est un cas particulier des nombreuses liaisons que les protéides peuvent contracter avec de très divers constituants de la matière vivante, cas particulier dans lequel aucune des fonctions chimiques actuellement envisagées comme support des affinités des protéides ne semble intervenir.

L'union entre protéides et lipides se fait surtout simplement par affinité physique de groupements semblables, appartenant les uns aux lipides, les autres aux protéides. Ces groupements sont des chaînes paraffines et des noyaux cyclaniques.

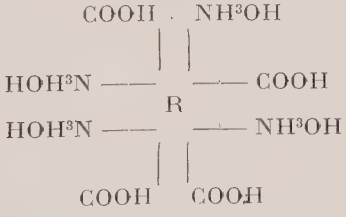
III. ELECTROPHORÈSE DES PROTÉIDES DU SÉRUM

Caractères ampholytes des protéides : anciens appareils à électrophorèse.

Les molécules des protéides en solution aqueuse sont ionisées, elles possèdent toutes, en effet, des fonctions acides et des fonctions basiques. Les protéides sont amphotères et jouent le rôle d'acides en milieu très alcalin et le rôle de bases en milieu très acide. On peut pour simplifier, schématiser une molécule d'holoprotéide ainsi :

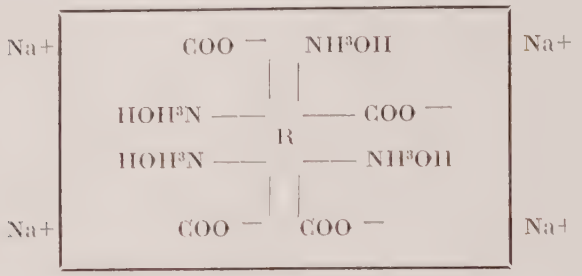


en milieu aqueux on a hydratation des NH^2

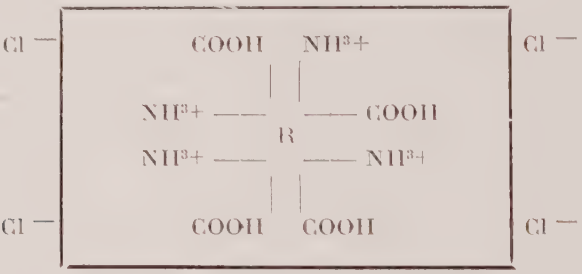


en milieu alcalin, les fonctions acides sont ionisées et elles le sont toutes, si le milieu est fortement alcalin (NaOH).

On a pour le protéidate de Na par exemple :



en milieu acide (HCl), on a au contraire un chlorure de protéide, par exemple :



entre ces deux zones, il existe un pH intermédiaire pour lequel le protéide ne sera pas plus un acide qu'une base, ou il ne sera pas plus chargé positivement que négativement, ou il sera neutre. Ce pH est dit pH isoionique (libération d'autant d'ions + que d'ions —) ou pH isoélectrique (neutralité électrique du protéide). pH isoélectrique et pH isoionique sont deux notions différentes, mais qui en pratique correspondent presque à un même pH dans la plupart des cas.

Pour mesurer le point isoélectrique, on cherche le pH pour lequel les molécules protéidiques sont électriquement neutres et ne se déplacent dans un champ électrique ni vers l'électrode positive ni vers l'électrode négative.

Si une solution de protéides, est placée dans un tube de section constante où existe un gradient électrique, les molé-

cules protéidiques ionisées se déplaceront sous l'effet de ce gradient. Si le pH de la solution est inférieur à l'isoélectrique, la molécule protéidique est dissociée en un cathion protéidique se dirigeant vers la cathode. Au contraire si le pH est supérieur à l'isoélectrique, comme ce sera le cas dans nos expériences, un anion protéidique se dirigera vers l'anode.

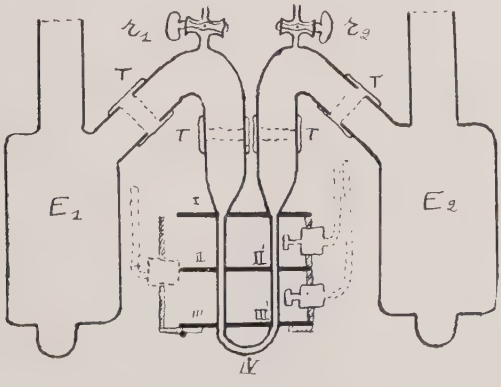
Ces propriétés des protéides sont utilisées depuis longtemps pour la détermination de leur point isoélectrique par exemple.

C'est Botho Schwerin qui eut le premier l'idée d'employer l'électrophorèse au fractionnement et à la purification de mélanges de systèmes colloïdaux. Son premier appareil était constitué par des cellules séparées par des membranes perméables (59).

Theorell (70, 71, 72, 73) employa récemment l'électrophorèse libre à des recherches analogues sur les ferments respiratoires.

Bennhold (6, 7, 8, 9), Pauli (55) et d'autres auteurs en étendirent l'emploi à toutes sortes de biocolloïdes. Mais c'est à Tiselius, élève de Svedberg d'Upsala que revient l'immense mérite d'avoir construit le premier appareil à électrophorèse différentielle vraiment commode.

Appareil à électrophorèse différentielle de Tiselius



L'appareil dont nous reproduisons le schéma de principe (78) ci-dessus, consiste en un tube en U central réuni par de grosses tubulures de caoutchouc T à des récipients de grand volume E_1 et E_2 servant d'électrodes. Au fond de ces récipients se trouve le dispositif d'amenée du courant. Il consiste en une dépression emplie de chlorure de potassium d'où sortent les électrodes proprement dites, elles sont réversibles (argent—chlorure d'argent). Le tube en U qui, sur une coupe horizontale, a une section interne rectangulaire de 30×25 mm. est fait de lames de verre parallèles, cimentées ensemble par un ciment résistant aux acides. Les parois de la portion courbe sont taillées dans du tube de verre rigoureusement calibré. Pour pouvoir suivre la migration de plusieurs composants, les branches du tube en U sont divisées en deux portions de chaque côté (II et II', III et III' du schéma). Ces portions sont solidaires et peuvent glisser sur des lames de verre planes lubréfiées avec un peu de vaseline. Une translation de plus de 3 mm. d'une des parties la sépare complètement de l'autre. Ces portions sont déplacées à l'aide d'un dispositif pneumatique constitué par des pistons P_1, P_2, P_3. Elles coulissent exactement à l'aide de petits rails métalliques. L'appareil se trouve ainsi divisé en quatre sections : I, II, III, IV.

Pour la mise en marche de l'appareil, celui-ci est placé à l'avance dans un thermostat muni de fenêtres et maintenant à $+ 0^{o},1$, $+ 0^{o},2$, la température d'un bain où plonge l'appareil. La solution saturée de KCl est placée dans des godets constituant le fond des récipients E_1, E_2. La solution à étudier est située dans la partie IV du tube en U, celle-ci est alors isolée du reste de l'appareil. On remplit à ce moment les réservoirs E, les tubes T et les sections I, II, III de l'appareil à l'aide de la solution tampon. Lorsqu'elle dépasse le niveau des robinets r_1, et r_2, ceux-ci sont fermés, et par le jeu des pistons, la section IV est mise en communication avec le reste de l'appareil. A ce moment le courant est lancé dans l'appareil et la vitesse de translation des frontières séparant la solution à étudier du tampon est enregistrée.

On établit alors un courant liquide de sens opposé à celui dans lequel se déplace la frontière à travers le tube en U. Pour cela on introduit progressivement dans l'un des récipients E un cylindre d'ébonite à l'aide d'un mouvement d'horlogerie. Ce dispositif compensateur est réglé pour que la vitesse de la colonne liquide soit la même que celle de la frontière. A la fin de l'expérience le piston pneumatique isole les fractions qui peuvent être ensuite retirées de l'appareil et examinées. L'observation des frontières mouvantes peut se faire par la méthode optique d'absorption, mais la méthode de Töpler (schlieren Methode) donne des résultats supérieurs, spécialement dans l'étude des mélanges. Voici le dispositif employé pour l'utilisation de cette méthode :

Un objectif de Dallmeyer d'une distance focale d'environ 0 m. 60 et de grande ouverture (10 cm.) est placé aussi près de l'appareil que possible. Une lampe et un diaphragme sont placés à environ 1 m. de distance de l'appareil du même côté du thermostat. L'image du diaphragme est projetée de l'autre côté de l'appareil, à environ 1 m. de la fenêtre du thermostat. A cet endroit une lentille de projection est placée, partiellement recouverte par un écran se déplaçant verticalement et se terminant par un bord tranchant bien dressé. Au lieu d'employer la lentille de projection, on peut se servir d'un objectif photographique. Par le réglage du bord de l'écran en face de la lentille, tout gradient de densité peut être observé et même des frontières très diffuses peuvent être localisées avec précision. On peut comparer les concentrations soit par les photographies obtenues avec cette méthode soit par celles obtenues avec la méthode d'absorption.

La méthode décrite par Tiselius permet donc d'observer soit les déplacements de frontières, soit des variations de concentration.

Tiselius a insisté sur l'importance du thermostat qui arrive à maintenir le tube en U de l'appareil aux environs de $+ 4^{o}$. En effet, pour cette température, l'eau présente un maximum de densité. Donc la dérivée $\frac{d D}{d \theta}$ est nulle pour cette tempéra-

ture[1]. Dans cette formule, D représente la densité de l'eau, θ la température.

Or, si une variation thermique locale se produit par échauffement électrique, les courants de convexion qui sont fonction des différences de densité entre des points de température différente, seront pratiquement nuls au voisinage de + 4°.

Rappelons que cette méthode a donné à Tiselius des résultats extrêmement intéressants (75, 76, 77), comme nous l'avons indiqué il a trouvé dans le sérum normal quatre protéides bien définis électro-chimiquement : une albumine, et trois globulines : α β et γ. Ces globulines auraient approximativement même poids moléculaire, mais des propriétés électrochimiques différentes. Le point isoélectrique de la globuline γ est pH 6 au lieu de 5,1 comme c'est le cas pour les composants α et β.

Les globulines α et β seraient probablement dissociables, la globuline γ serait stable.

Enfin la fonction d'anticorps n'est transportée qu'avec la fraction globuline γ.

D'autres auteurs : Lewis, Longsworth, Th. Shedlovsky, Duncan, Mac Innes, ont étudié des sérums et du plasma dans un appareil semblable à celui de Tiselius en employant en particulier pour l'observation le procédé nommé « Schlieren scanning Methode ». Par cette méthode, ces auteurs auraient trouvé dans le plasma les quatre types de mobilités et de concentrations trouvés par Tiselius et correspondants à l'albumine, et aux trois globulines α, β, γ. Ils trouvent, en outre, puisqu'ils opèrent sur le plasma, un cinquième type de mobilité correspondant au fibrinogène (29, 31, 30, 32).

L'appareil de Tiselius a rendu et rendra d'immenses services, mais son prix est très élevé et il ne peut pas être construit avec l'outillage habituel d'un laboratoire. Machebœuf, cherchant à séparer des fractions plus volumineuses pour en

1. On sait que la dérivée $f'(\theta)$ d'une fonction $f(\theta)$ s'annule quand cette fonction passe par un maximum ou un minimum.

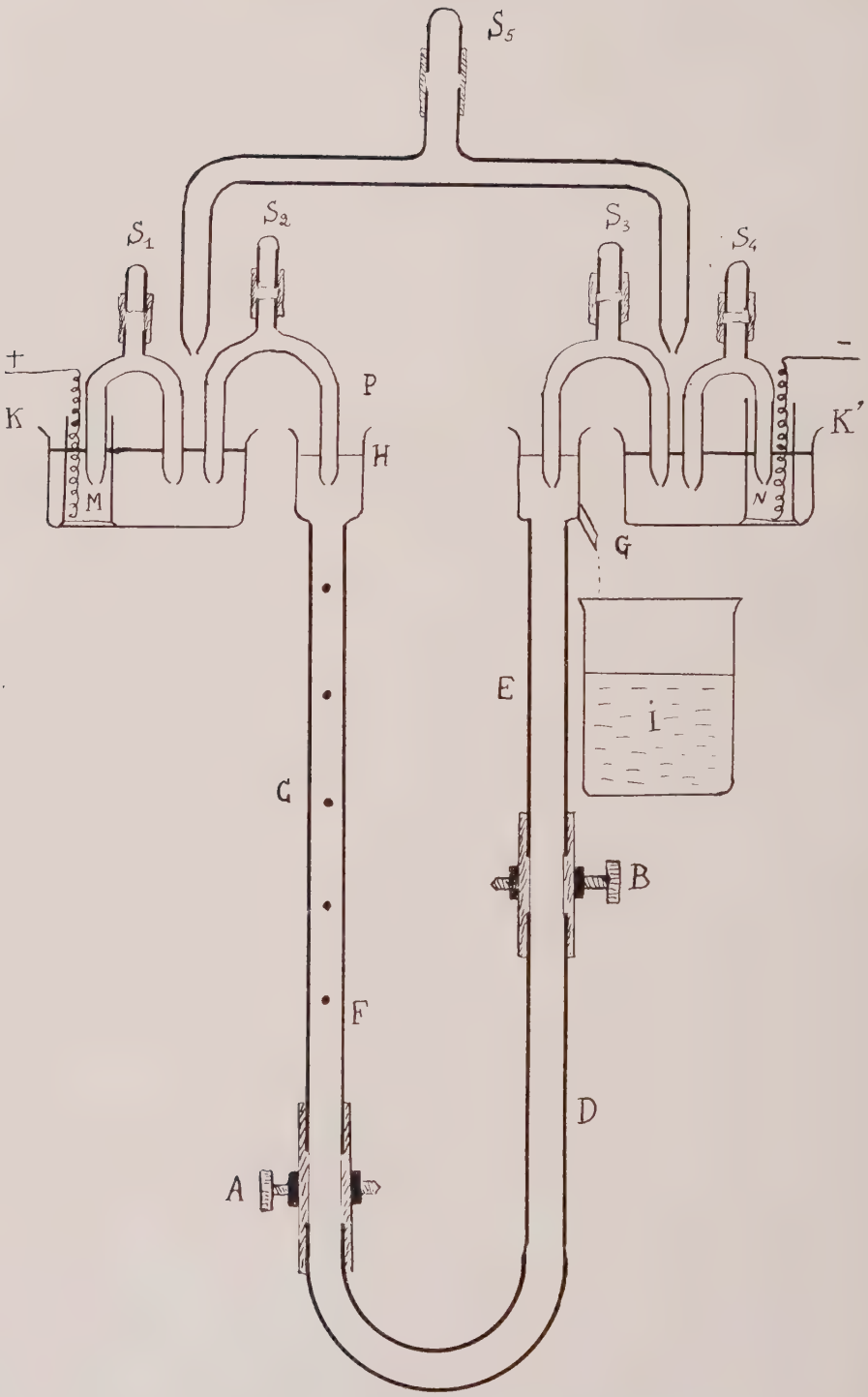
permettre l'étude chimique, a eu l'idée de construire un appareil beaucoup plus simple et d'une contenance bien supérieure.

Appareil de Machebœuf permettant la séparation de fractions protéidiques par électrolyse.

Le schéma page 40 évite une longue description. Un tube en U en trois tronçons, PA, AB, BG, constitue l'essentiel de l'appareil. Le tube PA, muni d'un repère F, est perforé en cinq points équidistants (diamètre des trous : 1 mm.). Ces trous sont obturés avant le remplissage de l'appareil par du collodion (une goutte que l'on laisse sécher puis une bande circulaire autour du tube pour bien maintenir l'obturation). A la fin de l'expérience, on peut prélever les diverses fractions qui sont contenues entre A et H en perforant successivement au moyen d'aiguilles hypodermiques, chacun des bouchons de collodion. On peut ainsi diviser le contenu final du tube PA en six fractions dont les volumes sont à peu près égaux.

En A et B, sont des pinces à mors parallèles, écrasant à volonté un tube de gomme. En G est un trop-plein fixant en H le niveau constant. Deux cristallisoirs K et K' contiennent une masse suffisante de solution tampon autour des électrodes d'argent chloruré qui plongent dans les éprouvettes M et N où se trouve une solution de chlorure de potassium. Des siphons S_1, S_2, S_3 et S_4 assurent les contacts entre les liquides.

La tubulure supérieure de chaque siphon est munie d'un tube de caoutchouc obturé par un fragment d'agitateur; ce dispositif permet le remplissage, par aspiration, de chaque siphon lorsqu'il est en place. Un grand siphon S_5 permet d'équilibrer les niveaux K et K' (donc aussi H) avant l'ouverture des pinces A et B.



Appareil à électro phorèse de Machebœuf

Utilisation de l'appareil

L'appareil étant entièrement démonté, on adapte au tube D, les deux tubes de gomme et les deux pinces A et B. On remplit D avec la solution protéidique étudiée, en évitant toute bulle d'air, et l'on ferme les deux pinces (renverser le tube D pour vérifier l'absence d'air).

On rince avec de la solution tampon, la partie des tubes de gomme A et B qui est au-dessus des pinces fermées, puis, sans ouvrir ces pinces, on adapte les tubes E et C que l'on remplit avec du tampon. On met le tout en place et l'on remplit tous les siphons. Tous les niveaux s'égalisent et l'excès de tampon s'écoule en G. Lorsque l'équilibre est atteint, on enlève le siphon S_5, puis on ouvre avec de grandes précautions et très lentement les pinces A et B. On établit enfin le contact entre les deux électrodes et les bornes du générateur électrique en orientant les pôles de façon que le déplacement des protéides par électrophorèse se fasse de A vers P (l'ensemble de l'appareil est maintenu constamment dans une glacière vers $+4^{o}$. Pour que les courants de convexion soient insensibles tous les liquides doivent être amenés à $+4^{o}$, avant l'ouverture des pinces).

La force électro-motrice à appliquer entre les électrodes est fonction des dimensions de l'appareil, des conductivités du liquide en expérience et de la solution tampon. Nous réglons cette force électro-motrice pour que le déplacement des protéides les plus rapides soit de 5 à 10 mm. par heure. Après deux heures environ, on voit apparaître dans le tube C, au-dessus du caoutchouc, la frontière entre la solution protéidique et la solution tampon. On voit ensuite cette frontière entre solution protéidique et solution tampon s'élever lentement dans le tube C. On peut arrêter l'électrophorèse lorsque la frontière arrive près de H. On peut aussi prolonger l'expérience, donc prolonger en somme le chemin parcouru, en ramenant toutes les douze heures la frontière au repère F en

introduisant très lentement du liquide tampon par l'évasement P ou mieux dans le récipient K. On laisse finalement monter la frontière jusqu'au voisinage de H et l'on arrête l'expérience en fermant les pinces A et B, puis en enlevant les siphons. Les protéides dont le déplacement est le plus rapide, sont montés à la partie supérieure du tube C. Ceux dont le déplacement est plus lent, sont seulement près de A ou même en arrière de A dans le tube D. Si l'on opère sur des solutions protéidiques préalablement concentrées par dialyse sous pression, les quantités de protéides présents dans chaque fraction sont très suffisantes pour divers essais chimiques ou biologiques.

Notons que l'appareil est stérilisable à l'autoclave, ce qui permet de travailler aseptiquement sur des solutions stériles (il est alors commode de remplacer les vases K et K' par de grandes fioles dont les goulots peuvent être obturés par du coton comme cela est déjà possible pour les orifices supérieurs de C, E, M et N).

La description de cet appareil a fait l'objet d'une communication de Machebœuf à la Société de Biologie, en mai 1941. La note n'est pas encore passée aux comptes rendus de cette Société mais l'auteur a bien voulu nous communiquer le texte que nous avons reproduit ci-dessus.

CHAPITRE II

Partie expérimentale

ESSAIS PRELIMINAIRES

Dans une étude préliminaire, nous avons mis au point l'utilisation de l'appareil, nous avons cherché quelle était l'allure générale du phénomène pour l'électrophorèse du sérum complet, puis pour celle de la solution d'albumines de ce sérum.

1. Electrophorèse d'un sérum sanguin total.

Nous nous servons, dans nos expériences, de la solution tampon suivante :

Phosphate monopotassique $\frac{N}{20}$: ...	1.000 cm³
Phosphate disodique $\frac{N}{20}$	330 cm³

Le pH de cette solution est : 7,2.

Pour amener le sérum et le tampon à la même concentration ionique, nous avons soit ajouté au sérum du tampon, et ramené ensuite au volume initial par dialyse sous pression, soit dialysé directement le sérum pur, sous faible pression contre tampon.

Enfin, dans une expérience, nous avons fait directement l'électrophorèse du sérum total frais. Dans ce dernier cas, les frontières, nettes au début, s'estompèrent dès le deuxième jour et l'allongement total de la colonne liquide fut beaucoup plus grand que dans les autres cas.

2. Electrophorèse d'une solution d'albumines d'un sérum sanguin.

Pour obtenir toutes les albumines nous partons d'un volume de sérum frais, soit 20 centimètres cubes pour fixer les idées. Nous y ajoutons un volume égal de solution préalablement neutralisée, saturée de sulfate d'ammonium. Nous dissolvons ensuite le précipité restant dans 10 cm^3 d'eau distillée et précipitons à nouveau par 10 cm^3 de la solution de sulfate d'ammonium. Nous obtenons ainsi (après filtration si c'est utile) une solution limpide d'un volume égal à trois fois environ le volume initial. Cette solution est placée dans un dialyseur à pression d'azote de Machebœuf et Sandor, contre tampon. Le tampon est renouvelé deux fois par jour. La température est maintenue à 0° par de la glace fondante, renouvelée fréquemment. La solution est laissée à la dialyse 48 h. environ. Le volume terminal doit être à peu près celui du sérum dont on est parti. La solution obtenue est alors placée dans l'appareil à électrophorèse. Au cours des essais, nous avons pu constater, que le volume de la solution tampon contenu dans K ou K' doit être de 1 litre environ. Ainsi le pH ne varie pas en P ou en G. Si ce volume était trop restreint, des réactions ioniques secondaires entraîneraient une baisse du pH du côté positif (par libération d'HCl provenant du chlorure de potassium de M). Dans ces conditions les pH en G et P pourraient être de part et d'autre de l'isoélectrique de certains des protéides étudiés. Au point du tube en U correspondant à leur isoélectrique, ces protéides se rassembleraient[1].

Au cours de nos essais, nous avons constaté qu'au début de l'électrophorèse, les frontières sont nettes qu'il s'agisse de sérum complet (tamponné ou non) ou de solution de sérum-albumines.

1. Machebœuf utilise ce fait dans un appareil encore inédit adapté à la détermination de l'isoélectrique des protéides.

Au cours de l'expérience, la frontière droite perdait généralement sa netteté, sauf avec certains sérums pathologiques (néphrose lipoïdique). La frontière gauche restait généralement nette.

Première expérience

Electrophorèse de sérum total de sang de cheval tamponné et concentré par dialyse sous pression.

Dans cette expérience, nous sommes parti de 20 cm³ de sérum. Nous avons ajouté 10 cm³ de solution tampon. Puis nous avons concentré dans le dialyseur sous pression, jusqu'à amener le volume à 12 cm³.

L'électrophorèse a duré 48 heures.

La longueur initiale entre frontières était de 23 cm. 5 et le volume de 8 cm³.

Le chemin parcouru par la frontière de tête était à la fin de l'expérience de 14 cm. La longueur de la colonne était à ce moment de 36 cm.

L'allongement de la colonne pendant l'expérience était donc de :

$$36 - 23{,}5 = 12{,}5 \text{ cm.}$$

Les frontières étaient : nette à gauche, moins nette à droite.

La partie la plus haute est incolore, car nous avons voulu être certain d'avoir toute la fraction et nous avons prélevé une portion au delà de la frontière.

Nos prélèvements I, II et III correspondaient dans leur ensemble à la totalité des protéides soumis à l'expérience, car en dehors de ces trois fractions, au-dessus des frontières de gauche et de droite, n'existaient plus de quantités appréciables de protéides; en effet, dans des échantillons prélevés en ces régions, on n'obtenait aucun précipité appréciable, par addition d'acide trichloracétique.

Les dosages nous ont donné les résultats suivants pour les fractions I et III (Fraction de tête et fraction de queue) :

Fraction I..... albumines 91 mgrs,7 pour 5 cm³
globulines 13 mgrs,1 pour 5 cm³
Fraction III ... albumines 31 mgrs,4 pour 5 cm³
globulines 288 mgrs,3 pour 5 cm³

Les rapports $\frac{\text{albumines}}{\text{globulines}}$ $\left(\frac{A}{G}\right)$ sont pour la :

Fraction I..... $\frac{A}{G}$: 7,05

Fraction III..... $\frac{A}{G}$: 0,17

Donc le rapport $\frac{A}{G}$ est 40 fois plus élevé en tête qu'en queue.

Conclusions. — Cette première expérience nous démontre que :

1° La fraction de tête est riche en albumines et pauvre en globulines, le rapport $\frac{A}{G}$ est de 7,05 pour cette fraction.

2° La fraction de queue contient environ vingt fois plus de globulines et trois fois moins d'albumines que celle de tête. Le rapport $\frac{A}{G}$ est pour cette fraction quarante fois plus faible que pour la précédente.

Cette expérience préliminaire, simple contrôle de technique, montre l'efficacité de l'appareil utilisé qui sépare remarquablement, même après un simple trajet de 14 cm., les globulines, protéides lents, d'avec les albumines, protéides plus rapides.

Dans les expériences suivantes, nous allons étudier le devenir des lipides du sérum au cours de l'électrophorèse, et leur action sur la mobilité des protéides auxquels ils sont liés.

Deuxième expérience.

Electrophorèse de sérum total de cheval ni tamponné ni concentré.

Nous sommes parti de 8 centimètres cubes de sérum, placés directement dans notre appareil. Nous avons surmonté ce sérum de chaque côté du tube en U, par notre tampon habituel (pH 7,2, donc très voisin de celui du sérum).

L'électrophorèse a duré 54 heures.

La longueur initiale entre frontières était de 23 cm. 5 pour un volume de 8 cm³.

En fin d'expérience, le chemin parcouru par la frontière de tête était de 34 cm. 5.

La longueur de la colonne entre frontières était alors de 52 cm. 5. L'allongement avait donc été de :

$$52{,}5 - 23{,}5 = 29 \text{ cm.},$$

soit un allongement horaire de 0 cm. 3 pour une intensité de 2 milliampères (la différence de potentiel entre les électrodes étant d'environ 350 volts).

A gauche, bien qu'il n'existât pas de frontière très nette, la coloration cessait assez brusquement pour permettre une mesure précise. A droite, la fin de la colonne colorée était beaucoup plus délicate à déterminer.

Nous avons recueilli trois fractions entre frontières :

Fraction I (tête)	9 cm³ 8
Fraction II	7 cm³
Fraction III (queue)	2 cm³ 8

Les analyses nous ont donné les chiffres suivants :

	Alb.	Glob.	Lipides des Alb.	Lipides des Glob.	Cholestérol des Alb.	Cholestérol des Glob.
	—	—	—	—	—	—
Fraction I (9 cc. 8).....	297 mg	31	7	perdu	1,65	»
soit pour 10 cc. (calculé) ...	303	31,6	7,14	»	1,97	»
Fraction II (7 cc.)	338,6	560,5	23	5,2	4,02	1,67
soit pour 10 cc. (calculé) ...	474,04	784,7	32,2	7,28	5,62	2,33
Fraction III (2 cc. 8)	25,2	260,7	1,9	1,5	0,42	0,25
soit pour 10 cc. (calculé) ...	88,2	912,4	6,65	5,25	1,47	0,87

Ces chiffres nous permettent de calculer les rapports suivants :

	Rapport $\frac{A}{G}$	Rapports lipid. × 100 / albumines	Rapports lipid. × 100 / globulines	Rapports chol. × 100 / albumines	Rapports chol. × 100 / globulines
	—	—	—	—	—
Fraction I	9,5	2,3	»	0,55	»
Fraction II	0,60	6,8	0,93	1,18	0,30
Fraction III ...	0,096	2,3	0,58	1,66	1,00

Conclusions :

1. Le fractionnement par électrophorèse fut extrêmement effectif, puisque le rapport entre albumines et globulines varie de 1 à 100 entre nos fractions extrêmes.

2. Malgré cette activité si grande du fractionnement, nous ne trouvons aucune fraction privée de lipides ou de cholestérol. Ceci suffirait à démontrer, s'il en était encore besoin, que les lipides et les stérols ne sont pas à l'état de simple suspension colloïdale, car les stérols et la plupart des lipides ne sont pas ionisables. L'électrophorèse les aurait laissés immobiles ou déplacés lentement comme de simples suspensions colloïdales, nous les trouverions donc tous très en arrière de la frontière postérieure, donc en dehors des trois fractions que nous avons analysées.

3. Les albumines qui cheminent en tête, car elles sont les plus rapides, entraînent plus de lipides que n'en contiennent en queue les globulines. Ceci est en accord avec les données anciennes de Machebœuf qui a vérifié que la quantité de lipides liés aux albumines est plus élevée que la quantité liée aux globulines.

4. Il semble bien que certaines albumines libres de tous lipides, ou peu chargées en lipides, soient les plus rapides de tous les protéides. Ensuite, viennent des albumines riches en lipides, puis restent en queue les lentes globulines et les lipides qui leur sont liés.

5. Pour ce qui est du cholestérol, nous constatons que toutes les fractions en contiennent, mais que les cénapses riches en cholestérol sont parmi les plus lentes. Ce fait est vrai, tant pour les albumines que pour les globulines. Parmi les albumines, le cholestérol se concentre en queue et, parmi les globulines, il fait de même. Cependant, le cholestérol, tout comme les lipides, se déplace par électrophorèse avec les protéides.

Troisième expérience.

Electrophorèse d'une solution d'albumines de sérum de cheval concentrées et tamponnées par dialyse sous pression.

La présence simultanée d'albumines et de globulines dans le sérum total étudié dans l'expérience précédente rendait délicate l'interprétation de certains résultats. Nous avons abordé, dans cette troisième expérience, l'étude séparée des albumines.

Nous sommes parti d'un volume de 20 cc. de sérum. Après précipitation, centrifugation et lavage du culot, nous avons eu 54 cc. de liquide. 90 heures de dialyse sous pression et à une température voisine de 0° ont ramené ce volume à 19 cc. Les albumines avaient donc alors une concentration équivalente à celle qu'elles avaient dans le sérum.

8 cc. de cette solution furent placés dans le tube de l'appareil et surmontés de part et d'autre du tampon habituel.

L'électrophorèse a duré 69 heures.

La longueur initiale entre frontières était de 23 cm. 5; à la fin, elle était de 58 cm. 5, soit un allongement de 35 cm.

Le chemin parcouru par la frontière de tête était de 46 cm. à la fin de l'expérience.

Comme pour l'expérience précédente, les frontières étaient très nettes au début; à la fin de l'électrophorèse, celle de gauche était assez nette, celle de droite difficile à repérer.

Le débit du courant était environ 2 milliampères, la différence de potentiel entre les électrodes était de 350 volts.

Nous avons recueilli trois fractions entre frontières :

Fraction I (tête)	4 cm³ 5
Fraction II (moyenne)	10 cm³
Fraction III (queue)	4 cm³

Les analyses nous ont donné les chiffres suivants :

	Albumines	Lipides	Cholestérol
Fraction I (4 cc. 5) .	117 mgr. 6	4 mgr. 2	Perdu
soit p. 10 cc. (calculé) .	258 mgr. 7	9 mgr. 24	»
Fraction II (10 cc.) .	228 mgr. 7	11 mgr. 6	3 mgr. 6
Fraction III (4 cc.) .	35 mgr. 6	1 mgr. 6	0 mgr. 63
soit p. 10 cc. (calculé) .	89 mgr.	4 mgr.	1 mgr. 57

Ces chiffres nous permettent de calculer les rapports suivants :

	Fraction I (tête)	Fraction II (moyenne)	Fraction III (queue)
Rapports : $\frac{\text{lipides} \times 100}{\text{albumines}}$	3,5	5	4,5
Rapports : $\frac{\text{cholestérol} \times 100}{\text{albumines}}$	»	1,5	1,8

Notons que pour la fraction I, une erreur d'expérience a rendu inutilisable le dosage du cholestérol. Mais nous avons pu, par une réaction qualitative, affirmer la présence de cholestérol dans cette fraction.

Ces résultats nous amènent aux conclusions suivantes.

Conclusions :

1° Le rapport entre lipides totaux et albumines, ne varie pas notablement dans les diverses fractions, donc tous les lipides sont liés aux albumines et n'influent pas profondément sur leur vitesse de transport. Cependant, la fraction de tête est un peu moins riche en lipides que les autres, ce fait doit correspondre à l'existence de quelques albumines libres de liaison avec des lipides et se déplaçant un peu plus vite que les cénapses. Ce fait corrobore parfaitement les résultats de la deuxième expérience.

Il semble donc que l'électrophorèse séparée des albumines donne le même résultat que l'électrophorèse des albumines en présence de globulines dans le sérum total.

2° Au sujet du cholestérol, un accident nous a privé d'un chiffre qui serait nécessaire pour une conclusion précise, mais nous pouvons déjà affirmer que le cholestérol, comme les autres substances lipoïdiques suit les albumines dans leur déplacement par électrophorèse.

Quatrième expérience.

Electrophorèse d'une solution d'albumines de sérum sanguin de néphrosique, concentrée et tamponnée par dialyse sous pression.

10 cc. de sérum traités par le sulfate d'ammonium, comme dans l'expérience n° 3 et soumis aux mêmes manipulations (centrifugation, lavage, etc...), ont donné une solution d'albumines d'un volume de 10 cc., après une dialyse sous pression contre tampon qui avait duré 96 heures.

L'électrophorèse a duré 68 heures.

La frontière de tête avait à la fin parcouru 48 cm. 5.

La longueur de la colonne entre frontière était de 37 cm. 5. L'allongement était de :

$$37{,}5 - 23{,}5 = 14 \text{ cm.}$$

Les frontières à la fin de l'expérience étaient : nette à gauche, assez nette à droite.

L'intensité était de 2 milliampères.

Entre les deux frontières, l'opalescence était parfaitement homogène.

Nous avons analysé une fraction de tête et une fraction de queue.

L'acide trichloracétique ne donnait pas de précipité dans les fractions situées au-dessus de la frontière de gauche. Les fractions situées au-dessus de la frontière de droite étaient très légèrement opalescentes et quoique l'acide trichloracé-

tique n'y donnât qu'une trace de précipité; nous avons analysé quelques centimètres cubes situés au-dessus de cette frontière.

Nous avions trois fractions :

Fraction I (tête), en dessous de la frontière de gauche.

Fraction II (queue), en dessous de la frontière de droite.

Fraction III (hors frontière, immédiatement au-dessus de la frontière de droite).

Nous avons obtenu les résultats numériques suivants :

	Rapport $\frac{\text{lipides}}{\text{albumines}}$
Fraction I.....	3,8
Fraction II.....	3
Fraction III (hors frontière), cette fraction ne contenait que des traces insignifiantes de lipides et de protéides (de l'ordre du 1/10 de mmg.).	

Conclusions :

Dans le sérum de néphrose lipoïdique, les albumines sont surchargées de lipides, le rapport $\frac{\text{lipides}}{\text{protéides}}$ est considérablement plus élevé que pour les albumines normales. Ceci correspond au fait bien connu qui est habituellement utilisé par les cliniciens pour la détermination de l'index lipo-albuminique de Machebœuf et Wahl.

Le sérum est opalescent ainsi que la solution des albumines que l'on en isole. On pouvait penser que dans ces sérums, une partie des lipides si abondants devaient être à l'état de simples micelles lipidiques, nos essais montrèrent qu'il n'en est rien. Les lipides se déplacent par électrophorèse et ils se déplacent à la même vitesse que les albumines. Tous les lipides sont donc liés aux albumines, bien plus, on ne rencontre pas dans ces sérums de néphrosiques d'albumines libres de lipides et se concentrant dans la fraction la plus rapide. Ici, au contraire, le rapport $\frac{\text{lipides}}{\text{albumines}}$ reste constant ou tend à être plus élevé dans les fractions de tête.

En résumé, tous les abondants lipides des albumines de néphrosiques sont liés aux protéides et il y a tellement de lipides présents qu'il n'y a plus d'albumines libres, mais seulement des cénapses lipido-protéidiques.

L'opalescence des sérums de néphrose lipoïdique n'est pas due à des micelles lipidiques, car cette opalescence se déplace avec une vitesse rigoureusement égale à celle des albumines et des lipides qui leurs sont liés.

Ce sont les cénapses albumino-lipidiques si surchargées en lipides qui ont elles-mêmes la propriété d'être opalescentes.

Si l'opalescence avait été due à des micelles lipidiques, indépendantes des protéides, l'électrophorèse prolongée que nous avons fait subir aux albumines de néphrosiques aurait rassemblé l'opalescence en une fraction distincte des albumines.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Les lipides présents dans le sérum sanguin suivent les protéides dans leur déplacement sous l'influence d'une force électro-motrice.

L'électrophorèse différentielle ne permet pas de séparer des lipides indépendants des protéides.

Toutes les fractions protéidiques que nous avons pu séparer, même après un très long cheminement électrophorétique, contiennent des lipides. Les albumines entraînent dans leur cheminement rapide la majeure partie des lipides, mais il en reste aussi en arrière avec les globulines.

Ces faits constituent une démonstration péremptoire de l'existence d'unions intimes entre lipides et protéides dans le sérum. La méthode d'électrophorèse différentielle que nous avons utilisée, sépare admirablement des colloïdes ou des substances à grosses molécules ionisables comme les protéides dès que leurs vitesses de cheminement électrophorétiques ne sont pas rigoureusement égales. Or pour un milieu commun donné, ces vitesses sont fonctions de la charge électrique, de la dimension et de la forme des particules ou des molécules soumises à l'action de la force électro-motrice. Si l'on voulait nier l'union des protéides et des lipides, il faudrait admettre que le hasard a conféré des vitesses identiques à ces deux types de substances, or, la plupart des lipides ne sont pas ionisables (exception : phosphoaminolipides), tandis que les protéides le sont, ce qui leur confère des charges électriques négatives importantes dans les conditions où nous nous sommes placés (pH 7,2). Les dimensions moléculaires des protéides sont hors de proportion avec celles des lipides.

La probabilité pour une égalité des vitesses électrophorétiques est infime s'il n'y a pas liaison.

De plus l'examen de notre expérience sur du sérum total montre que les lipides qui cheminent avec les albumines sont justement en proportions égales à celles que l'on est habitué à rencontrer dans les albumines séparées par d'autres méthodes (sulfate d'ammonium, sulfate de magnésie. sulfate de sodium, précipitation acide, etc...). Cette concordance confirme nos conclusions.

Notons que dans les fractions les plus rapides des albumines, on constate une teneur en lipides un peu plus faible que dans les autres fractions, ce fait doit correspondre à l'existence d'albumines libres de toutes attaches avec les lipides. Les lipides doivent freiner un peu les albumines auxquelles ils sont liés.

Dans le cas d'un sérum d'homme atteint de néphrose lipoïdique, nous constatons que les lipides extrêmement abondants qui sont présents dans la solution d'albumines se déplacent tous en bloc avec les albumines. Il y a tellement de lipides qu'il n'existe plus d'albumines libres mais seulement des cénapses lipido-protéidiques. Cette étude nous a en outre permis de montrer que l'opalescence bien connue du sérum néphrosique n'est pas due à la présence d'une émulsion de lipides simplement suspendus dans le sérum. L'opalescence est inséparable des cénapses lipido-protéidiques qui constituent, nous venons de le voir, la totalité des albumines de sérum. C'est seulement à ces cénapses particulièrement riches en lipides qu'est due l'opalescence du sérum néphrosique.

SERMENT

En présence des maîtres de cette école, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je donnerai mes soins à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Reconnaissant envers mes maîtres, je tiendrai leurs enfants et ceux de mes confrères pour des frères, et s'ils devaient apprendre la médecine ou recourir à mes soins, je les instruirai et les soignerai sans salaire ni engagement.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir heureusement de la vie et de ma profession, honoré à jamais parmi les hommes, si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

Vu :
Le Doyen,
MAURIAC.

Vu, bon à imprimer :
Le Président,
MACHEBŒUF.

Vu et permis d'imprimer :
Bordeaux, le 2 juillet 1941
L'Inspecteur général de l'Enseignement supérieur
Recteur de l'Académie,
A. LIRONDELLE.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Abderhalden**. — (1902) *Zschr. f. Phys. Chem.* **37**, 495.
2. **Abderhalden** et **Komm**. — (1924) « Ueber die anhydridstruktur des Proteins ». *Ibid.*, 139-181.
3. **Achart** et **Grigaut** (1933) cité d'après **Lematte**, *Revue de Médecine*, février 1933.
4. **Bang**. — (1918) *Biochem. Zeits.* **90**, 383.
5. **Battut** (V. M). — (1939) Thèse de pharmacie, Bordeaux.
6. **Bennhold**. — (1930) « Verhandl. deutsch ». *Ges. inn Medizin XLII Kongress Wiesbaden*, p. 353.
7. **Bennhold**. — (1931) *XLIII Kongress Wiesbaden*, p. 211.
8. **Bennhold**. — (1932) *Ergeb. inn. Medizin und Kinderheilkunde* **42**, 275.
9. **Bennhold**. — (1933) *Kolloid*, **62**, 129.
10. **Chick**. — (1914) *Biochem. Journ.* **8**, 404.
11. **Delage**. — (1939). Thèse doct. Sc. Paris.
12. **Fleitmann**. — *Ann. Chem. u. Pharm.* **66**, 381.
13. **Freund** et **Lustig**. — (1926) *Biochem. Zeitschr.* **167**, 355.
14. **Furth** et **Fischer**. — (1924) *Biochem. Zeitschr.* **154**, 1-23.
15. **Gardner** et **Gainsborough** . — (1927) *Biochem. Journ.* **21**, 141 à 147.
16. **Guerber**. — (1894) *Sitzungsbericht. d. Wuezburger med. Ges.*
17. **Haas** et **Trautmann**. — (1923) *Zeitschr. phys. Chem.* **127**, 52.
18. **Hammarsten**. — (1902) *Ergenuisse der Physiol.* **1**, 330.
19. **Handosky**. — (1925) « Une suite d'articles », *Arch. f. die Gesamte Physio.* **210**, 35 à 69, particulièrement 62 à 69 par **Handosky**, **Lohmann** et **Bosse**.

19*bis*. **Handosky** et **Wagner**.

20. **Hardy**. — (1905) *J. of. Physiol.* **33**, 251.

21. **Hardy** (W.-B.) et **Gardiner**. — (1910) *J. of Physiol.* **40**, 68.
22. **Hartley**. — (1915). *Brit. Journ. Exper. Pathol.* **6**, 180.
23. **Haslam**. — (1913) *Biochem. Journ.* **7**, 492.
24. **Herzfeld**. — (1922) *Scheveir. Med. Wochenschr.* 411.
25. **Hofmeister**. — (1884) *Zeitschr. f. physiol. Chemie.* **14**, 165.
26. **Hofmeister**. — (1888) *Arch. für exp. Path. u. Pharm.* 1888 à 1890, **24** *à* **28**.
27. **Kander**. — (1886) *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.* **20**, 411.
28. **Kijotari**. — (1923) *Bioch. Zeitschr.* **134**, 322.
29. **Lewis**, **Longsworth** (L.-G.), **Shedlovsky** (Th.), **Duncan** (Th.), **Mc Innes**. — (1939) *Journal of exp. Med.* 17 juin 1939.
30. **Longsworth** (L. G.). — (1939) *J. Am. Ch. Soc.* **61**, 529.
31. **Longsworth** (L.-G.). — (1939) *Am. New-York. Acad. Sc. 39.*
32. **Longsworth** (L.-G.) et **Innes** (Mc). — (1939) *Chem. Rev.* **24**, 271.
33. **Machebœuf** (M. A.). — (1927) Thèse Doctorat en Médecine, Paris.
34. **Machebœuf** (M. A.). — (1928) Thèse Doctorat ès Sciences, Paris.
35. **Machebœuf** (M. A.). — (1929) *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **11**, 268 et **11**, 485.
36. **Machebœuf** (M. A.). et **Wahl** (R.). — (1931) *Bull. Soc. chim. Biol.* 13, n° 5, 486, n° 5, 511 et n° 7, 736.
37. **Machebœuf** (M. A.) et **Wahl** (R.). — (1931) *Bull. Soc. Biol.* **13**, p. 511.
38. **Machebœuf** (M. A.), **Wahl** (R.) et **Sandor** (G.). — (1931) *Bull. Soc. Biol.* **13**, n° 5, 504.
39. **Machebœuf** (M. A.) et **Sandor** (G.). — (1931) *Bull. Soc. Chim. Biol.* **13**, n° 7, 745.
40. **Machebœuf** (M. A.) et **Fethke**. — (1932) *Bull. Soc. Chimie Biol.* **14**, 507-530.
41. **Machebœuf** (M. A.) et **Sandor** (G.). — (1932) *Bull. Soc. Chim. Biol.* **14**, 1168.
42. **Machebœuf** (M. A.) et **Januskiewicz** (Mme). — (1937) *Bull. de la Soc. de Ch. Biol.* **19**, 694.
43. **Machebœuf** (M. A.). — (1937) *Etat des lipides dans la matière vivante*, Hermann et Cie, Paris.

44. **Machebœuf** (M. A.), **Tayeau** (F.) et **Battut**. — (1938) C. R. Soc. Biol. **129**, 1481 et 1184.

45. **Machebœuf** (M. A.), **Tayeau** (F.) et **Battut**. — (1939) C. R. Soc. Biol. **130**, 481.

46. **Machebœuf** (M. A.) et **Dizerbo** (L.). — (1939) C. R. Soc. Biol. (Tome CXXXII, p. 268).

47. **Machebœuf** (M. A.) et **Perrimond-Trouchet**. — (1939) C. R. Soc. Biol. **132**, p. 585.

48. **Machebœuf** (M. A.) et **Tayeau** (F.). — (1941) *Bull. de la Soc. de Biol.* **23**, n° 1-3, janvier-mars.

49. **Malerba**. — (1894) *Acad. de Scienze Fisiche et Med. di Napoli*, Fasc. 3-5.

50. **Marcus-Emil**. — (1899) *Zeitschr. f. Physiol. Chimie*, **28**, 5-59.

51. **Metzger**. — (1932) Thèse Médecine, Strasbourg.

52. **Moerner**. — (1902) *Zeitschr. Phys. Chem.* **34**, 207.

53. **Okabe**. — (1928) *Journ. of Bioch.* **8**, 459.

54. **Panum** . — (1851) *Wirchow. Archiv.* **3**, 1, 251.

55. **Pauli-Valko**. — (1933) *Kolloid. Chemie der Eiwersskörper*, 2nd. ed. Chapter 10, Dresden u. Leipzig.

56. **Porges** et **Spiro**. — (1903) *Beitr. z. Chem. Physiol. u. Path.* **3**, 277.

57. **Porges** et **Neubauer**. — (1908) *Biochem. Zeitschr.* **7**, 152, 177.

58. **Piettre**. — (1928) C. R. Ac. Sc. **186**, 1657 et **192**, 894.

59. **Prausnitz** (von P. A.) and **Reitstötter** (J.). — (1931) « Elektrophorese, Elektroosmose, Elek'rodialyse » in *Feüssigkeiten*, p. 120, 122, 130, 138, 147, 149. Dresden u. Leipzig.

60. **Robertson**. — (1913) *Journal of Biol. Chemistry*, **13**, 325.

61. **Sandor** (G.). — (1934) Thèse Doctorat es sciences, Paris, G. Doin, édit.

62. **Schmidt**. — (1862) *Reichters u. du Bois-Raymond archiv.*

63. **Schultz**. — (1902) *Zeitschr. Phys. Chem.* **34**, 207.

64. **Sœrensen**. — (1923) C. R. Lab. Carlsberg, **15**, n° 9.

65. **Svedberg** (T.). — (1926) *Journ. Amer. Soc.* 48.

66. **Svedberg** (T.) et **Tiselius** (A.). — (1926) *J. Am. Ch. Soc.* **48**, 2272.

67. **Svedberg** (T.) et **Sjagren**. — (1930) *J. Amer. Chem. Soc.* **52**, 2855.

68. **Svedberg** (T.). — (1926) *Zeitschr. f. physik. Chem.* **121**, 67 et **127**, 51.

69. **Tayeau** (F.). — (1939) Thèse Doctorat ès Sciences, Bordeaux.

69*bis*. **Tayeau** (F.). — (1941) C. R. Acad. Sc. **212**, 575.

70. **Theorell**. — (1926) *Biochem Zeit.* **175**, 297.

71. **Theorell**. — (1930) *Biochem Zeit.* **223**, 93.

72. **Theorell**. — (1934) *Biochem. Zeit.* **275**, I, II, 19-30.

73. **Theorell**. — (1935) *Biochem. Z.*, **278**, 291.

74. **Tiselius** (A.). — (1930) *Nova acta regia Soc. Sci. Upsaliensis*, 7, n° 4.

75. **Tiselius** (A.). — (1937) *Biochem. J.* **31**, 313.

76. **Tiselius** (A.). — (1937) *Biochem J.* **31**, 146.

77. **Tiselius** (A.). — (1937) *Trans. Far. Soc.* **33**, 524.

78. **Tiselius** (A.). — (1937) *A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures* ».

79. **Trœnsegaard** (N.) et **Koudahl**. — (1926) *Die acetylierung der Proteine des Blutes Zeitschrift f. physiol. Chem.* **153**, 93 à 110.

80. **Trœnsegaard** (N.) et **Koudahl**. — (1926) *Zeits. f. physio. Chemie*, **153**, 111-118.

81. **Willstaëter** et **Rohdewald**. — (1934) *Zeitschr. f. Physiol. Chem.* 225, 110.

82. **Wrinch** (C. M.). — (1936) Nature 137, 411; (1936) 138, 651; (1937) 139, 972; (1938) 141, 581.

83. **Young** (E. G.). — (1922) *Proceed. Royal Soc. Lond. B.* **93**, 15.

Imprimerie Bière, 18, rue du Peugue, Bordeaux — 1941.